



(19) SU (11) 1490961 (13) A1
(51) 5 C 12 N 15/52

СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ РЕСПУБЛИК

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО СССР (ГОСПАТЕНТ СССР)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к авторскому свидетельству

1

(21) 4262311/13
(22) 170687
(31) 22739
(32) 14.10.86
(33) HU
(46) 150794 Бюл № 13
(71) Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, Ветэкс Контрактор Лтд (HU)
(72) Фодор И.И., Мельников А.А., Янош Мопнар (HU), Петер Хорват (HU)
(56) Kotewicz et al Gene, 35, 249, 1985.
(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИРУСА САРКОМЫ РАУСА
(57) Изобретение относится к генетической инженерии. Согласно предлагаемому способу ко-

2

дирующий обратную транскриптазу рой-ген ДНК вируса саркомы Рауса встраивают в плазмидный вектор экспрессии, в частности в рUC 9, непосредственно за lac-промотором, полученные фрагменты используют для трансформации бактерий Есоi, после чего отбирают рекомбинантную ДНК, обладающую набором последовательностей, обеспечивающих репрессию и индукцию вирусного рой-гена, связывание его мРНК с рибосомой, а также последовательностью инициации и терминирования трансляции. Полученной рекомбинантной ДНК трансформируют Есоi, клетки бактерий разрушают и фермент очищают моноомной хроматографией.

BEST AVAILABLE COPY

SU

1490961

A1

Изобретение относится к биотехнологии и молекулярной биологии, а именно к способу получения фермента обратной транскриптазы вируса саркомы Рауса (RSV).

Способ заключается в том, что кодирующий обратную транскриптазу *pol*-ген выделенный из ДНК вируса саркомы Рауса, встраивают с помощью лигазы в плазмиду с большим числом копий таким образом, чтобы указанный ген находился в плазмиде непосредственно за *lac*-промотором, который может быть репрессирован и легко индуцирован. Полученной лигазной смесью затем трансформируют *E. coli*, после чего отбирают трансформированные клетки, несущие ДНК с набором последовательностей, обеспечивающих подавление и экспрессию вирусного *pol*-гена, связывание его МРНК с рибосомой, а также с последовательностями, обеспечивающими инициацию и терминацию трансляции. Рекombинантной плазмидой трансформируют *E. coli*, бактериальные клетки после индукции разрушают и извлеченный сырой фермент - обратную транскриптазу подвергают очистке.

Пример 1. Получение плазмидной ДНК.

6 мкг ДНК плазмиды pSRA-2 подвергают последовательно обработке рестриктазами *Xma*I, *Xho*I и *Pst*I. Проверку эффективности расщепления электрофорезом в агарозном геле производят после каждого гидролиза.

Также выполняют гидролиз ферментами *Pst*I и *Sal*I 2 мкл ДНК pUC 9.

Обе ДНК подвергают осаждению 96%-ным этанолом и трехкратной промывке 70%-ным этанолом. Каждую из двух осажденных фракций растворяют в 20 мкл лигирующего буфера.

Смесь, приготовленную из 280 нг расщепленной ДНК pUC 9 и 1350 нг расщепленной ДНК pSRA-2, дополняют необходимыми компонентами и после добавления 10 единиц лигазы оставляют на ночь в холодильнике при 8°C.

С помощью лигазной смеси (5-10 мкл) проводят трансформацию клеток штамма бактерий *E. coli* HB 101, предварительно обработанных CaCl_2 . Клетки растирают на агарных пластинках, приготовленных с питательной средой LB и дополненных 0.5% глюкозы и 20 мкл/мл ампициллина. После инкубации в течение 18 ч при 37°C проводят анализ выращенных колоний, определяют размер содержащейся в них плазмиды.

Отбирают штаммы, содержащие исконую плазмиду размером в 5.5 кв. (pMF 14). Эти клетки выращивают в жидкой питательной среде, содержащей глюкозу и ампицил-

лин. Затем производят выделение плазмиды. Плазмиду проверяют с помощью рестриктаз (*Pst*I, *Sal*I, *Bam*HI, *Hind*III), а также их сочетаний и сопоставляют с оригинальной картой *pol*-гена.

Отобранный клон далее используют для тестирования фермента, поступая при этом следующим образом.

2 мл культуры, выращенной за ночь на питательной среде LB с глюкозой и ампициллином, используют для посева в 20 мл указанной среды, и проводят инкубацию при энергичном встряхивании при 37°C. При достижении плотности E_{650} 1.0 к культуре добавляют свежеприготовленный водный раствор IPTG, доводя концентрацию последнего до 1 мМ, и продолжают инкубацию еще в течение 60 мин.

Собранные центрифугированием клетки обрабатывают лизоцимом и лизирующим раствором.

Лизирующий раствор:

1% Triton X-100

0.2% NP-40

1 мМ EDTA (этилендиаминтетрацетат)

2 мМ DTT (дитиотреитол)

2 мМ PMSF

10 мМ фосфата натрия (рН 8.0)

Разрушают сферопласты. Прозрачную фракцию, полученную в количестве 200-400 мкл, непосредственно используют для тестирования ферментативной активности.

Проверенный, продуцирующий обратную транскриптазу клон выращивают и индуцируют синтез белка, продукт из культуры выделяют с целью характеристики фермента.

Пример 2. Препаративное выделение обратной транскриптазы.

800 мл культуры *E. coli* HB 101, содержащей плазмиду pMF 14, выращивают на питательной среде LB с добавленной глюкозой (0.5%) и ампициллином (100 мкг/мл) до достижения плотности 2.2.

После центрифугирования клетки суспендируют в 50 мл питательной среды M9, не содержащей глюкозы, но содержащей ампициллин. После инкубации с энергичным встряхиванием в течение 30 мин добавляют IPTG до достижения концентрации 10 мМ, затем продолжают инкубацию еще в течение 90 мин. Собранные центрифугированием клетки замораживают жидким азотом и до обработки хранят при -20°C.

Все операции по выделению фермента проводят при 4°C.

Замороженные клетки суспендируют в 8 мл 10%-ного раствора сахарозы, содержащего 10 мМ фосфата натрия (рН 8.0), и к суспензии добавляют 2 мл раствора лизоци-

мл в этом же фосфатном буфере с концентрацией 20 мг/мл. Спустя 10 мин испаривают 11 мл лизирующего раствора и два слоя осторожно перемешивают. Полученный раствор подвергают центрифугированию при 100000 g в течение 1 ч, затем к верхнему слою добавляют пятимолярный раствор NaCl до достижения конечной концентрации 0,1 М (в данном примере для этого к 43,5 мл верхнего слоя следует добавить 870 мкл 5 М раствора NaCl) и этот раствор наносят на колонку с DE 32 размерами 2x12 см, уравновешенную буфером А (10% глицерина, 5% сахарозы, 0,2% NP-40, 10 мМ фосфата натрия, pH 8,0, 1 мМ DTT, 0,5 мМ EDTA, 0,1 мМ PMSF, 0,1 м NaCl).

Бета-субъединица обратной транскриптазы не сорбируется на носителе, в то время как значительная часть ДНК-полимеразы, а также нуклеиновые кислоты, мешающие последующим хроматографическим разделениям, оказываются сорбированными.

Колонку промывают буфером А до тех пор, пока несорбируемое вещество полностью смывается (экстинкция элюата A_{230} 0,1), и пропущенный раствор (140 мл) подвергают диализу трижды по 4 ч против 1 л буфера Б.

Буфер Б:

10% глицерина
0,2% NP-40 (ионидет Р-40)
10 мМ фосфата натрия (pH 8,0)
1 мМ DTT
0,5 мМ EDTA
0,1 мМ PMSF

Полученный после диализа продукт наносят на колонку с фосфоцеллюлозой P11 размерами 2x20 см. Колонку промывают буфером Б до снижения экстинкции до A_{230} 0,1 (в данном примере на это потребуется 200 мл буфера), затем через колонку пропускают градиент буфера Б в режиме 0,01–1,0 М, собирая фракции объемом 4 мл.

Из каждой фракции отбирают пробу объемом 3 мкл для определения активности обратной транскриптазы. Активные фракции, элюированные в интервале 0,25–0,33 М, собирают и объединенный элюат подвергают диализу в течение 3x8 ч против 3x2 л буфера В.

Буфер В:

10% глицерина
0,2% NP-40
1 мМ DTT
0,5 мМ EDTA
10 мМ фосфата калия (pH 8,0)

После диализа вещество наносят на колонку с DE 32 размерами 1x5 см, несорбируемые вещества смывают буфером В.

Обратную транскриптазу затем элюируют буфером В, содержащим 0,5 М KCl, собирают фракции объемом 0,4 мл. Активность обратной транскриптазы во фракциях определяют, отбирая из них пробу объемом 1 мкл.

Объединенные активные фракции (около 3 мл) подвергают диализу в течение 18 ч против буфера Г.

10 Буфер Г:

50% глицерина
50 мМ фосфата калия (pH 8,0)
50 мМ KCl
1 мМ DTT
0,5 мМ EDTA

В результате описанных процедур очистки получается 1 мл раствора обратной транскриптазы, обладающего активностью 20 ед/мкл.

20 Суммарное количество фермента, вырабатываемого из 800 мл исходной бактериальной культуры, составляет таким образом около 20000 ед.

25 П р и м е р 3. Препарат в состоянии поддерживать синтез ДНК в стандартной реакционной смеси в течение не менее 2 ч. Денатурирующий гелеэлектрофорез РНК не показывает изменений при инкубации РНК с препаратом, полученным согласно предлагаемому способу, в течение 4 ч. Это доказывает, что очищенная рекомбинантная обратная транскриптаза не содержит неспецифических нуклеаз.

35 Рекомбинантная обратная транскриптаза синтезирует поли dT в системе затравка - матрица гА/dT₄₅ как в присутствии ионов Mg⁺⁺, так и в присутствии ионов Mn⁺⁺.

40 Оптимальная концентрация этих ионов составляет 3 и 2 мМ соответственно. Наличие этих ионов в концентрации 6 мМ приводит к незначительному снижению скорости реакции.

45 Фермент выполняет свои функции так же в системе затравка - матрица поли гСт/олиго^{GG}, но лишь в присутствии Mn⁺⁺. Активность фермента на этом субстрате составляет около 25% от активности, измеряемой на классическом субстрате поли гА/dT.

50 В системе поли А⁺ мРНК/олиго dT (т.е. при синтезе кДНК) оптимальная для фермента концентрация Mg⁺⁺ составляет 6 мМ, тогда как концентрация Mn⁺⁺ составляет 2 мМ. 7,5 ед.акт. фермента включают [3H]d-ТТФ в количестве, соответствующем образованию 0,8–1,6 нмоль кДНК. Размер получаемого продукта составляет 200–1600

нуклеотидов в случае поли А* мРНК дрож-
 филлы и 400-7000 нуклеотидов в случае зна-

чительно более длинной гетерогенной ядер-
 ной поли А* РНК печени крысы.

Формула изобретения

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОБРАТНОЙ
 ТРАНСКРИПТАЗЫ ВИРУСА САРКОМЫ
 РАУСА, заключающийся в том, что в плаз-
 миду рUC9 непосредственно за lac-промо-
 тором с помощью лигазы встраивают Pst -
 XhoI-фрагменты плазмиды рSRA-2, пол-
 ученной смесью ДНК трансформируют
 клетки E.coli, после чего по устойчивости к
 антибиотику отбирают трансформирован-
 ные клетки, из которых выделяют ДНК, за-

5 тем из них по молекулярной массе отбира-
 ют ДНК, которая содержит набор последс-
 вательностей, обеспечивающих репрессию и
 экспрессию вирусного pol-гена и связыва-
 ние его мРНК с рибосомой, а также после-
 10 довательности, инициирующие и термини-
 рующие трансляцию, затем выделенной
 рекомбинантной ДНК трансформируют
 клетки E.coli HB 101, после культивирова-
 ния бактериальные клетки разрушают и
 15 выделяют обратную транскриптазу ионо-
 обменной хроматографией

BEST AVAILABLE COPY

Редактор Л. Павлова

Составитель А. Спундз
 Техред М.Моргентал

Корректор О. Кравцова

Заказ 441

Тираж
 НПО "Поиск" Роспатента

Подписное

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101